

## NEW BACTERIUM AND PRODUCTION OF L-AMINO ACID USING THE SAME

Patent Number: JP2000270882

Publication date: 2000-10-03

Inventor(s): MATSUMAE HIROAKI;; TANIGUCHI TOMOYASU;; SHIBATANI TAKEJI;; YOSHIOKA RYUZO

Applicant(s): TANABE SEIYAKU CO LTD

Requested Patent:  JP2000270882

Application Number: JP20000011171 20000120

Priority Number(s):

IPC Classification: C12N15/09; C12N1/21; C12N9/10; C12P13/04

EC Classification:

Equivalents:

### Abstract

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a new bacterium useful for producing an L-amino acid, containing a plasmid containing a phenylalanine transaminase gene derived from a bacterium belonging to the genus *Paracoccus* at the downstream of a promoter functioning in a host bacterium.

**SOLUTION:** This bacterium is obtained by adding a recombinant plasmid incorporated with a DNA encoding a phenylalanine transaminase derived from a bacterium (e.g. *Paracoccus denitrificans*, etc.), belonging to the genus *Paracoccus* at the downstream of a promoter functioning in a host bacterium to the host bacterium being *Escherichia coli*. The new recombinant bacterium has a base sequence between the promoter and an initiation codon of phenylalanine transaminase, being sequence of the formula. An L-amino acid can be efficiently obtained by treating the bacterium or its treated material with an oxo-acid compound in the presence of an amino acid donor.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2000-270882  
(P2000-270882A)

(43) 公開日 平成12年10月3日 (2000.10.3)

(51) Int.Cl.  
C 12 N 15/09  
1/21  
9/10  
C 12 P 13/04  
// (C 12 N 1/21

識別記号  
ZNA

F I  
C 12 N 15/00  
1/21  
9/10  
C 12 P 13/04

ZNAA

テ-マコ-ト(参考)

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-11171(P2000-11171)  
(22) 出願日 平成12年1月20日 (2000.1.20)  
(31) 優先権主張番号 特願平11-13688  
(32) 優先日 平成11年1月22日 (1999.1.22)  
(33) 優先権主張国 日本 (JP)

(71) 出願人 000002956  
田辺製薬株式会社  
大阪府大阪市中央区道修町3丁目2番10号  
(72) 発明者 松前 裕明  
兵庫県神戸市東灘区甲南町2丁目5番10-  
802  
(72) 発明者 谷口 友康  
埼玉県戸田市本町2丁目16番3-305  
(72) 発明者 柴谷 武爾  
兵庫県神戸市東灘区鴨森台3丁目18番5号  
(74) 代理人 100076923  
弁理士 箕浦 繁夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規微生物およびそれを用いるL-アミノ酸の製法

(57) 【要約】

【課題】 高いフェニルアラニン・トランスアミナーゼ活性を有する、新規組換え微生物を提供する。また該微生物を用いた工業的有利なL-アミノ酸の製法を提供する。さらに、これらを利用したN-置換アミノ酸誘導体および2-オキソイミダゾリジン誘導体の製法を提供する。

【解決手段】 宿主微生物中で機能するプロモータの下流に、バラコッカス属に属する微生物由来のフェニルアラニン・トランスアミナーゼをコードするDNAが組込まれた組換えプラスミドを、エシェリシア・コリである宿主微生物中に含有せしめた組換え微生物であって、該プロモータとフェニルアラニン・トランスアミナーゼの翻訳開始コドンとの間の塩基配列が配列番号5に示された配列である、組換え微生物。該微生物を利用したL-アミノ酸の製法。また、N-置換アミノ酸誘導体および2-オキソイミダゾリジン誘導体の製法。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】宿主微生物中に機能するプロモータの下流に、バラコッカス属に属する微生物由来のフェニルアラニン・トランスアミナーゼをコードするDNAが組込まれた組換えプラスミドを、エシェリシア・コリである宿主微生物中に含有せしめた組換え微生物であって、該プロモータとフェニルアラニン・トランスアミナーゼの翻訳開始コドンとの間の塩基配列が配列番号5に示された配列である、組換え微生物。

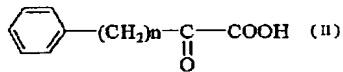
【請求項2】バラコッカス属に属する微生物が、バラコッカス・デニトリフィカンスである請求項1記載の微生物。

【請求項3】該プロモータがlacプロモーターである、請求項1記載の組換え微生物。

【請求項4】請求項1～3のいずれか1項記載の微生物を用いて、フェニルアラニン・トランスアミナーゼを生産する方法。

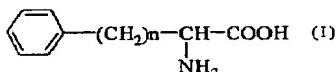
【請求項5】請求項1～3のいずれか1項記載の微生物または該微生物の処理物を、アミノ供与体の存在下に、一般式(I)

【化1】



(但し、式中、nは1または2を表す。)で示されるオキソ酸化合物に作用させることを特徴とする、一般式(I)

【化2】



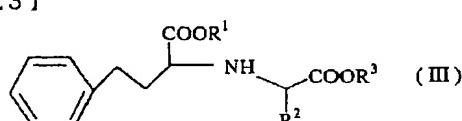
(但し、nは前記と同一意味を有する。)で示されるL-アミノ酸の製法。

【請求項6】アミノ供与体が、L-アスパラギン酸又はL-グルタミン酸である請求項5記載の製法。

【請求項7】オキソ酸化合物が2-オキソ-4-フェニル酪酸でありL-アミノ酸がL-2-アミノ-4-フェニル酪酸である、請求項5記載の製法。

【請求項8】請求項7記載の製法によりL-2-アミノ-4-フェニル酪酸を得、該化合物をエステル化した後、 $\alpha$ -位に脱離基を有する $\alpha$ -置換カルボン酸又は $\alpha$ -置換カルボン酸エステル化合物と反応させて、一般式(I)

【化3】



(但し、式中、R<sup>1</sup>は、低級アルキル基、アラルキル基、シクロアルキル基またはアリール基を表す。R

10

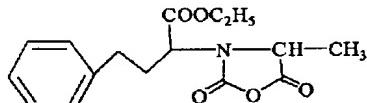
<sup>2</sup>は、低級アルキル基、アラルキル基またはアリール基を示す。R<sup>3</sup>は、水素原子、低級アルキル基、アラルキル基、シクロアルキル基またはアリール基を表す。)で示される化合物を得、ついでR<sup>3</sup>が水素原子でない場合には、所望により、該化合物を接触還元及び/又は酸処理することにより置換基R<sup>3</sup>を除去することを特徴とする、N-置換アミノ酸誘導体の製法。

【請求項9】R<sup>1</sup>がエチル基、R<sup>2</sup>がメチル基である請求項8記載の製法。

【請求項10】N-置換アミノ酸誘導体が、N-[(1S)-エトキシカルボニル-3-フェニルプロピル]-L-アラニンである請求項9記載の製法。

【請求項11】請求項10記載の製法によりN-[(1S)-エトキシカルボニル-3-フェニルプロピル]-L-アラニンを得、該化合物をさらに酸塩化物と反応させて、下式

【化4】

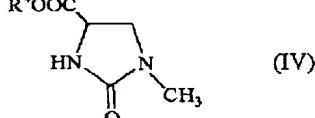


で示される化合物に変換することを特徴とするN-置換アミノ酸誘導体の製法。

【請求項12】請求項10記載の製法により得たN-[(1S)-エトキシカルボニル-3-フェニルプロピル]-L-アラニンを、その活性エステル体(カルボキシル基における反応性誘導体)に変換した後、一般式

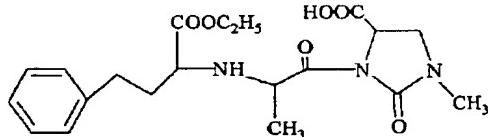
(IV)

【化5】



(但し、R<sup>4</sup>は低級アルキル基又はフェニル基置換低級アルキル基を表す。)で示される2-オキソイミダゾリジン-4-カルボン酸誘導体と縮合反応させ、得られた化合物をさらに酸処理および/又は接触還元して置換基R<sup>3</sup>を除去して、下式

【化6】



で示される化合物を得、所望により、該化合物をその薬理学的に許容し得る塩とすることを特徴とする、2-オキソイミダゾリジン誘導体またはその薬理学的に許容しうる塩の製法。

50 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、フェニルアラニン・トランスアミナーゼ生産能を有する新規組換え微生物および該微生物を用いるL-アミノ酸の製法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】フェニルアラニン・トランスアミナーゼ活性を有するバラコッカス属等の微生物を利用して、L-アミノ酸をオキソ酸化合物から酵素的に製造する方法が知られていた。具体的には例えば、L-フェニルアラニンをフェニルビルビン酸から製造する方法 (Applied Biochemistry and Biotechnology, 第11巻、第367頁、1985年) や医薬として有用な2-オキソイミダゾリジン誘導体(塩酸イミダブリルなど)の製造中間体であるL-2-アミノ-4-フェニル酪酸を、2-オキソ-4-フェニル酪酸から製造する方法(特開昭60-156394号)が知られていた。

【0003】また、バラコッカス・デニトリフィカンスからフェニルアラニン・トランスアミナーゼをコードする遺伝子が単離されており、これを含む組換えプラスミドを宿主大腸菌に導入した組換え微生物が報告されている(Oueら、J.Biochem., 第121巻、第161-171頁、1997年; Takagiら、Biotechnology and Applied Biochemistry, 第13巻、第112-119頁、1991年; 特開平1-153084号)。前記組換え微生物は、親株であるバラコッカス・デニトリフィカンスよりも高いフェニルアラニン・トランスアミナーゼ生産能を有していた。

【0004】しかしながら、L-アミノ酸類の工業的製造に利用するためには、さらに高いフェニルアラニン・トランスアミナーゼ生産能を有する微生物の育種が望まれていた。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、高いフェニルアラニン・トランスアミナーゼ活性を有する、新規組換え微生物を提供することにある。また該微生物を用いた工業的有利なL-アミノ酸の製法を提供することにある。さらに、これらを利用したN-アルキル化アミノ酸エステルおよび2-オキソイミダゾリジン誘導体の製法を提供することにある。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、鋭意研究した結果、トランスアミナーゼ発現プラスミドから、バラコッカス・デニトリフィカンスに由来するフェニルアラニン・トランスアミナーゼ翻訳領域の上流域に存在したロダニース様蛋白質翻訳領域を除去するとともに特定塩基配列に置きかえることにより、組換え微生物のトランスアミナーゼ生産能が顕著に高まることを見出し、本発明を完成した。

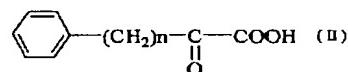
【0007】すなわち、本発明は、宿主微生物中で機能するプロモータの下流に、バラコッカス属に属する微生物由来のフェニルアラニン・トランスアミナーゼをコー

ドするDNAが組込まれた組換えプラスミドを、エシェリシア・コリである宿主微生物中に含有せしめた組換え微生物であって、該プロモータとフェニルアラニン・トランスアミナーゼの翻訳開始コドンとの間の塩基配列が配列番号5に示された配列である、組換え微生物である。

【0008】また、前記微生物又は該微生物の処理物を、アミノ供与体の存在下に一般式(I)

## 【0009】

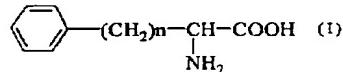
## 【化7】



【0010】(但し、式中、nは1または2を表す。)で示されるオキソ酸化合物に作用させることを特徴とする、一般式(I)

## 【0011】

## 【化8】



【0012】(但し、nは前記と同一意味を有する。)で示されるL-アミノ酸(L-2-アミノ-4-フェニル酪酸等)の製法である。

【0013】さらに、前記製法により得たL-2-アミノ-4-フェニル酪酸から、N-置換アミノ酸誘導体、さらに2-オキソイミダゾリジン誘導体またはその薬理学的に許容しうる塩を製造する方法である。

## 【0014】

【発明の実施の形態】本発明の微生物は、バラコッカス属微生物由来のフェニルアラニン・トランスアミナーゼを発現するためのプラスミド(以下、トランスアミナーゼ発現プラスミドと称する)を、エシェリシア・コリの宿主微生物中に導入することにより得られる。

【0015】トランスアミナーゼ発現プラスミドは、フェニルアラニン・トランスアミナーゼをコードするDNAが、プロモータの下流に機能的に連結されており、フェニルアラニン・トランスアミナーゼが該プロモータの調節の下に発現する。

【0016】本発明の微生物の含有するトランスアミナーゼ発現プラスミドは、バラコッカス属微生物由来のフェニルアラニン・トランスアミナーゼをコードするDNAがプロモータの下流に組込まれた組換えプラスミドであって、該プロモータとフェニルアラニン・トランスアミナーゼの翻訳開始コドンとの間の領域は配列番号5に示された塩基配列を有する。

【0017】バラコッカス属に属する微生物は、フェニルアラニン・トランスアミナーゼを产生する能力を有する微生物であれば限定されず、例えば、バラコッカス・デニトリフィカンス等が挙げられる。

【0018】フェニルアラニン・トランスアミナーゼをコードするDNAとしては、バラコッカス属微生物由来のフェニルアラニン・トランスアミナーゼ遺伝子の中のフェニルアラニン・トランスアミナーゼをコードする翻訳領域を用いることができる。

【0019】バラコッカス属微生物由来のフェニルアラニン・トランスアミナーゼ遺伝子は、例えば、文献(タカギら、Biotechnology and Applied Biochemistry、第13巻、第112-119頁、1991年)記載の方法と同様に、ショットガンクローニングによりバラコッカス属微生物から以下のようにして単離することができる。

【0020】まずバラコッカス属微生物から染色体DNAを調製する。これを適当な制限酵素で処理(Sau3AIによる部分切断等)した後、適当なベクタープラスミドのプロモータ下流(pLG339のBamHI切断部位、pUC18のマルチクローニングサイト等)に連結する。ついで、得られた組換えプラスミドを用いて、宿主大腸菌を形質転換する。宿主大腸菌として、例えばアスバラギントランスアミナーゼ酸及び芳香族アミノ酸トランスアミナーゼの同時欠損変異を有し、該欠損変異に基いてフェニルアラニン要求性を示す菌株(例えばエシェリシア・コリDG30株(Journal of Bacteriology、第130巻、第441-444頁、1987年)を用いれば、目的遺伝子を含む組換えプラスミドが導入された菌株は、L-フェニルアラニンを含まない最小培地で、L-フェニルアラニン要求性が相補された菌株として容易に選択できる。

【0021】選択された形質転換株を培養し、得られた菌体を用いて、フェニルアラニン・トランスアミナーゼ活性を測定することにより、組換えプラスミド上に目的遺伝子が含まれていることを確認することができる。

【0022】バラコッカス属微生物由来のフェニルアラニン・トランスアミナーゼ遺伝子は、上記のような方法により単離できるほか、既知の塩基配列情報を用いて、取得することもできる。

【0023】例えば、オウエラの文献(J.Biochem.、第121巻、第161-171頁、1997年)及び後記配列表の配列番号1には、バラコッカス・デニトリフィカンス(バラコッカス・デニトリフィカンス IF012442)から単離したフェニルアラニン・トランスアミナーゼ遺伝子を含む染色体断片の塩基配列が開示され、同文献及び後記配列表の配列番号2には、当該フェニルアラニン・トランスアミナーゼのアミノ酸配列が開示されている。

【0024】開示された塩基配列の情報をもとにプライマーやプローブを設計し、これらを用いるPCR(Polymerase chain reaction)法、コロニーハイブリダイゼーション法などを適宜組み合わせて、DNAライブラリーから、バラコッカス属微生物由来のフェニルアラニン・トランスアミナーゼ遺伝子を取得できる。

【0025】DNAライブラリーは、バラコッカス属微

生物の染色体DNAを用い、例えば、「Molecular Cloning」(Sambrook, J., Fritsch, E. F.およびManiatis, T.著、Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1989年に発刊)に記載の方法により調製できる。

【0026】かくして単離されたバラコッカス属微生物由来のフェニルアラニン・トランスアミナーゼ遺伝子の塩基配列を決定し、翻訳領域を同定できる。この翻訳領域を含むDNA断片を切り出して、フェニルアラニン・トランスアミナーゼをコードするDNAとして用いることができる。

【0027】フェニルアラニン・トランスアミナーゼをコードするDNAとしては、具体的には、例えば配列番号1の第1024~2205番目の塩基からなる塩基配列を含むDNAが挙げられるが、これに限定されない。

【0028】このほか、配列番号1の第1024~2205番目の塩基で示される塩基配列を有するDNAと、ストリンジエントな条件下のハイブリダイゼーション(すなわち6×SSCまたはこれと同等の塩濃度のハイブリダイゼーション溶液中、50~60℃の温度条件下、約16時間ハイブリダイゼーションを行い、6×SSCまたはこれと同等の塩濃度の溶液等で必要に応じて予備洗浄を行った後、1×SSCまたはこれと同等の塩濃度の溶液中で洗浄を行うこと)によりハイブリダイズし得るDNAであって、フェニルアラニントランスアミナーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNAが挙げられる。

【0029】フェニルアラニン・トランスアミナーゼをコードするDNAは、自然界に存在するフェニルアラニン・トランスアミナーゼ遺伝子の翻訳領域を用いることもできるが、その一部の塩基配列を変更したものであってよい。ひとつのアミノ酸をコードするコドンは各々1~6種類知られており、塩基配列を変更する際は、通常、コードするアミノ酸配列に変更が生じないように設計される。設計した塩基配列を持つDNAは、化学合成したDNAの連結、DNAの断片化と結合、部位特異的変異導入法(site specific mutagenesis)(Proceedings of National Academy of Sciences、第81巻、第5662~5666頁、1984年)等を組み合わせることによって取得できる。

【0030】フェニルアラニン・トランスアミナーゼをコードするDNAを、適当なベクタープラスミド中のプロモータ下流に連結することにより、トランスアミナーゼ発現プラスミドを得ることができる。この際、該プロモータとフェニルアラニン・トランスアミナーゼの翻訳開始コドンとの間の塩基配列が、特定の配列、すなわち後記配列表の配列番号5に示された配列となるようにすればよい。

【0031】プロモータとフェニルアラニン・トランスアミナーゼの翻訳開始コドンとの間の塩基配列は、フェ

ニルアラニン・トランスアミナーゼをコードするDNAの制限酵素処理などによるDNA断片化、断片化したDNAの結合、化学合成したリンカー-DNAの連結、部位特異的変異導入法、PCR法等を適宜組合せることによって、後記配列表の配列番号5に示された塩基配列となるように構築することができる。

【0032】プロモータは、宿主微生物である大腸菌（エシェリシア・コリ）中で機能し得るプロモータであればよく、特に限定されない。このようなプロモーターとしては、例えばlacプロモーター（大腸菌ラクトースオペロンのプロモーター）が挙げられる。lacプロモーターの塩基配列を後記配列表の配列番号3に示した。

【0033】ベクターブラスミドは、宿主微生物である大腸菌（エシェリシア・コリ）中で複製可能なブラスミドであれば特に限定されない。このようなベクターブラスミドとしては、例えばpBluescriptSK (+) (Stratagene社製)、pLG339 (Gene、第18巻、第335頁、1982年、ATCC37131)、pUC18 (Gene、第33巻、第103頁、1985年、ATCC37253) 等が挙げられる。このうち、pUC18がとりわけ好ましい。

【0034】トランスアミナーゼ発現プラスミドを、通常の形質転換法により宿主微生物となるエシェリシア・コリに導入することにより、本発明の組換え微生物を得できる。このような宿主微生物は特に限定されないが、例えば、エシェリシア・コリDH5株、エシェリシア・コリJM109株、エシェリシア・コリHB101株 (Journal of molecular biology、第41巻、第459頁、1969年、ATCC33694)、エシェリシア・コリJM109株 (蛋白質・核酸・酵素、第29巻、第294頁、1981年) 等が挙げられる。このうち、エシェリシア・コリHB101株が好ましい。

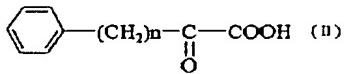
【0035】本発明の組換え微生物において、フェニルアラニン・トランスアミナーゼの高発現が実現する。フェニルアラニン・トランスアミナーゼ活性は、フェニルビルビン酸、2-オキソ-4-フェニル酪酸などを基質とし、L-グルタミン酸、L-アスパラギン酸などをアミノ供与体として含む反応溶液中、微生物菌体を酵素源として添加し、公知の方法により測定できる。

【0036】本発明の組換え微生物もしくは該微生物の処理物を利用した酵素反応により、オキソ酸化合物（フェニルビルビン酸または2-オキソ-4-フェニル酪酸）からL-アミノ酸（L-フェニルアラニンまたはL-2-アミノ-4-フェニル酪酸）を製造することができる。

【0037】すなわち、本発明の組換え微生物もしくは該微生物の処理物を、アミノ供与体の存在下に、一般式(I)

【0038】

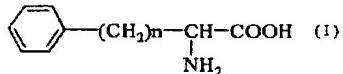
【化9】



【0039】(但し、式中、nは1または2を表す。)で示されるオキソ酸化合物に作用させることにより、一般式(I)

【0040】

【化10】



【0041】(但し、nは前記と同一意味を有する。)で示されるL-アミノ酸を製造できる。

【0042】酵素反応に用いる微生物（生菌体、培養物等）及びそれらの処理物（洗浄菌体、乾燥菌体、培養上清、菌体破碎物、菌体自己消化物、菌体抽出物等）は、フェニルアラニン・トランスアミナーゼ活性を有するものであればよく、その形態は特に限定されない。

【0043】微生物の培養は常法により行うことができる。例えば、炭素源、窒素源、有機栄養源、無機塩類などを含む通常の栄養培地のpHを5.0～9.0に調整し、これに微生物を接種したのち10～45°C、好ましくは28～37°Cで、好気的に培養すればよい。本発明の微生物の含有する発現プラスミドにおいて、トランスアミナーゼがlacプロモータの制御下に発現するよう構築されている場合には、培地中にラクトース、IPTG (イソプロビル-1-チオ-β-D-ガラクトシド)などの酵素誘導物質を添加することが、トランスアミナーゼ発現を高めるために望ましい。

【0044】微生物の培養液から遠心分離またはろ過等により生菌体を得ることができる。また、生菌体を生理食塩水等で洗浄することにより洗浄菌体を得ることができ、生菌体や洗浄菌体等を凍結乾燥またはアセトン乾燥することにより乾燥菌体を得ることができる。また、生菌体、洗浄菌体等を種々の物理化学的方法（例えば、超音波、フレンチプレス、浸透圧、凍結融解、アルミナ破壊、溶菌酵素、界面活性剤または有機溶媒等で処理）で処理することにより、菌体の破碎物を得ることができ、これら菌体や細胞の破碎物からろ過または遠心分離などにより固形物を除去することによって菌体の抽出物を得ることができる。

【0045】基質とするオキソ酸化合物およびアミノ供与体は、遊離の形でも塩の形でも反応系に供することができる。

【0046】アミノ供与体としては、例えばL-アスパラギン酸、L-グルタミン酸が挙げられ、L-グルタミン酸が好ましい。アミノ供与体は、オキソ酸化合物1モルに対して通常1～3モル、とりわけ1.3～1.5モル使用するのが好ましい。

【0047】酵素反応は、フェニルアラニン・トランスアミナーゼの安定性を考慮して40°C未満で行うのが好ましいが、とりわけ28~37°Cで実施するのが好ましく、また、そのpHは7~9となるよう調整するのが好ましい。また、上記酵素反応に際しては、臭化セチルトリメチルアンモニウム、臭化セチルビリジニウム等の界面活性剤を反応液中に0.001~0.1%程度になるよう添加しておくことにより酵素反応を促進させることもできる。

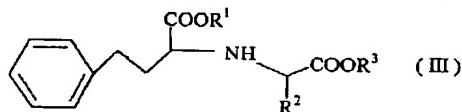
【0048】本酵素反応は反応時間を適当に調整することにより反応進行率を100%にまで高めることができる。反応液中に生成した目的L-アミノ酸の分離精製は、通常のイオン交換樹脂法やその他の公知方法を単独で、或いは組合せて容易に行なうことができる。

【0049】上記のようにして得たL-アミノ酸(L-2-アミノ-4-フェニル酪酸)から、既知の方法(米国特許第4542234、同第4344949、特開昭59-181247、特開昭60-13715、特開昭63-174955および特開昭63-174956記載の方法等)により、N-置換アミノ酸誘導体へ導くことができる。

【0050】すなわち、上記のようにして得たL-2-アミノ-4-フェニル酪酸をエステル化した後、 $\alpha$ 位に脱離基を有する $\alpha$ -置換カルボン酸又は $\alpha$ -置換カルボン酸エ斯特ル化合物と反応させて、一般式(III)

【0051】

【化11】



【0052】(但し、式中、R<sup>1</sup>は、低級アルキル基、アラルキル基、シクロアルキル基またはアリール基を表す。R<sup>2</sup>は、低級アルキル基、アラルキル基またはアリール基を示す。R<sup>3</sup>は、水素原子、低級アルキル基、アラルキル基、シクロアルキル基またはアリール基を表す。)で示される化合物を得、ついでR<sup>2</sup>が水素原子でない場合には、所望により、該化合物を接触還元及び/又は酸処理(好ましくは接触還元)することにより置換基R<sup>2</sup>を除去することにより、N-置換アミノ酸誘導体を得ることができる。

【0053】一般式(III)で示される化合物において、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>又はR<sup>3</sup>で示される低級アルキル基(炭素数1~4のアルキル基)としては、メチル基、エチル基、プロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基などが挙げられる。アラルキル基としては、ベンジル基、 $\alpha$ -フェネチル基、 $\beta$ -フェネチル基などが挙げられる。シクロアルキル基としては、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、シクロヘプチル基などが挙げられる。アリール基としては、無置換フェニル基、アルキル基置換フェニル基(トリル基

等)、ハロゲン原子・ニトロ基置換フェニル基などが挙げられる。

【0054】一般式(III)で示される化合物において、R<sup>1</sup>がエチル基、R<sup>2</sup>がメチル基であることが好ましい。

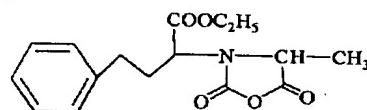
【0055】 $\alpha$ -置換カルボン酸又は $\alpha$ -置換カルボン酸エ斯特ル化合物が $\alpha$ 位に有する脱離基としては、ハロゲン原子(塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子など)、スルホニルオキシ基(脂肪族置換スルホニルオキシ基、芳香族置換スルホニルオキシ基、ハロスルホニルオキシ基等)が挙げられる。

【0056】かくして、各種アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害剤の共通な合成中間体として有用なN-置換アミノ酸誘導体であるN-[(1S)-エトキシカルボニル-3-フェニルプロピル]-L-アラニンなどを製造できる。

【0057】得られたN-[(1S)-エトキシカルボニル-3-フェニルプロピル]-L-アラニンはさらに、特開昭62-48696記載の方法により、酸塩化物(例えば、塩化ギ酸の反応性誘導体(ホスゲンなど))と反応させることによって、下式

【0058】

【化12】



【0059】で示される化合物に変換することができる。

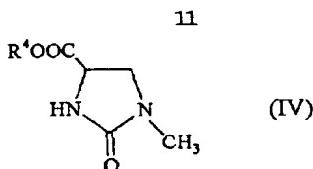
【0060】また、本発明の製法において得られる生成化合物(L-アミノ酸、N-置換アミノ酸誘導体)は、遊離の形であってもよく、或いは塩の形であってもよい。かかる塩としては、無機酸塩(塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩等)および有機酸塩(コハク酸塩、マレイン酸塩、フマール酸塩、メタンスルホン酸塩等)が挙げられる。

【0061】さらに、上記で得られたN-置換アミノ酸誘導体から、既知の方法(特開昭58-203971記載の方法等)により、2-オキソイミダゾリジン誘導体またはその薬理学的に許容しうる塩へ導くことができる。

【0062】すなわち、上記で得られたN-[(1S)-エトキシカルボニル-3-フェニルプロピル]-L-アラニンを、その活性エ斯特ル体に変換した後、一般式(IV)

【0063】

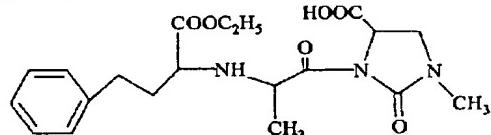
【化13】



【0064】(但し、R<sup>1</sup>は低級アルキル基又はフェニル基置換低級アルキル基を表す。)で示される2-オキソイミダゾリジン-4-カルボン酸誘導体と縮合反応させ、得られた化合物をさらに、酸処理及び/又は接触還元(好ましくは酸処理)して置換基R<sup>1</sup>を除去して、下式

【0065】

【化14】



【0066】で示される化合物を得、所望により、該化合物をその薬理的に許容し得る塩とすることにより、2-オキソイミダゾリジン誘導体またはその薬理学的に許容しうる塩を製造できる。かかる塩としては、無機酸塩(塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩など)、アルカリ金属塩(ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩等)、アルカリ土類金属塩(カルシウム塩、マグネシウム塩等)、有機酸塩(コハク酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、メタンスルホン酸塩など)、有機塩基との塩(リジン塩、オルニチン塩等)が挙げられる。

【0067】N-[(1S)-エトキシカルボニル-3-フェニルプロビル]-L-アラニンの活性エステル体とは、そのカルボキシリ基における反応性誘導体を意味する。このような活性エステル体は、例えば前記化合物を、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール又は1-ヒドロキシコハク酸イミドと、縮合剤(ジシクロヘキシカルボジイミド等)の存在下で反応させることにより得られる。

【0068】一般式(IV)においてR<sup>1</sup>で示される低級アルキル基としては、tert-ブチル基などが挙げられる。フェニル基置換低級アルキル基としては、ベンジル基などが挙げられる。このうちR<sup>1</sup>は、ベンジル基であることが好ましい。

【0069】かくして、塩酸イミダブリル(化学名:(4S)-1-メチル-3-((2S)-2-[N-((1S)-1-エトキシカルボニル-3-フェニルプロビル)アミノ]プロピオニル]-2-オキソイミダゾリジン-4-カルボン酸塩)など、アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害剤として有用な2-オキソイミダゾリジン誘導体またはその薬理学的に許容しうる塩を製造することができる。

【0070】以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説

明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。【0071】なお、下記実施例において、各操作は特に明示がない限り、「モレキュラークローニング(Molecular Cloning)」(Sambrook, J., Fritsch, E.F.及びManiatis, T.著、Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1989年に発刊)に記載の方法により行うか、または、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

【0072】

【実施例】実施例1 トランスマニナーゼ高発現プラスミドpPAP243及びこれを含む大腸菌形質転換株の取得

(1)発現プラスミドpPAP142の調製

タカギらの文献(Biotechnology and Applied Biochemistry, 第13巻, 112-119頁, 1991年; 特開平1-153084)記載の方法に従って、バラコッカス・デニトリフィカヌス(Paracoccus denitrificans IF012442)の染色体DNAからトランスマニナーゼ遺伝子(フェニルアラニントランスマニナーゼ遺伝子)を含むDNA断片を単離し、これを含む組換え発現プラスミドpPAP142を得た。

【0073】pPAP142は、トランスマニナーゼ遺伝子を含むバラコッカス・デニトリフィカヌス染色体DNA断片(約2.2kb)が、ベクタープラスマドpUC18のlacプロモータ下流に連結されている。この染色体DNA断片の塩基配列を後記配列表の配列番号1に示し、この染色体DNA断片にコードされるトランスマニナーゼのアミノ酸配列を後記配列表の配列番号2に示した。この染色体DNA断片中、トランスマニナーゼ遺伝子翻訳領域(配列番号1の第1024~2205番目の塩基に相当する塩基配列を有する)の上流には、バラコッカス・デニトリフィカヌス由来の、プロモータ領域と、ロダニース様蛋白質をコードする領域(配列番号1の第166~927番目の塩基に相当する塩基配列を有する)が存在する。

【0074】pPAP142中、lacプロモータ(配列番号3で示した塩基配列を有する)とバラコッカス由来トランスマニナーゼ遺伝子翻訳領域(配列番号1の第1024~2205番目の塩基に相当する塩基配列を有する)との間の塩基配列は、後記配列表の配列番号4に示した通りである。配列番号4の第237~998番目の塩基に相当する塩基配列は、ロダニース様蛋白質をコードする領域の塩基配列である。

【0075】pPAP142を導入した大腸菌中では、バラコッカス・デニトリフィカヌス由来のトランスマニナーゼ遺伝子はベクター中のlacプロモータによって発現すると考えられる。

【0076】(2)発現プラスミドpPAP243の調製  
前記(1)で得たプラスミドpPAP142から、バラコッカス(バラコッカス・デニトリフィカヌス)由来染色

体DNA断片中の、遺伝子源本来のプロモータ領域とロダニース様蛋白質をコードする領域を欠失させ、大腸菌でのトランスアミナーゼの発現に必要な領域のみを残したプラスミドを、以下のようにして構築した。（構築方法の概略図を図1に示した。）まず、pPAP142を鋳型とするPCR（polymerase chain reaction）により、pPAP142中のトランスアミナーゼ翻訳域N末端側（177bp）とその上流非翻訳域の一部（95bp）を含む断片を増幅した。

【0077】PCRのためのプライマーとしては、後記配列表の配列番号9及び配列番号10に示した塩基配列を有する合成オリゴヌクレオチドを各々センスプライマー及びアンチセンスプライマーとして用いた。

【0078】センスプライマーの配列は、上流非翻訳域部分配列（配列番号1の第929～958番目の塩基に相当）のN末端側を一部改変してKpnI認識部位が生成されるように設計した。また、アンチセンスプライマーの配列は、トランスアミナーゼ翻訳域中の部分配列（配列番号1の第1171～1200番目の塩基に相当）に基づいて設計した。

【0079】PCRの反応は、5μl（0.09μg）のプラスミド pPAP142、各4μMのプライマー、1.0単位のDNAポリメラーゼ、5μlの10倍緩衝液、各5μl（2mM）のデオキシNTPおよび30.5μlの水からなる混合液を用いて、94°Cで30秒、55°Cで30秒、72°Cで1分の工程を、30回繰り返すことにより行った。反応後、反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、目的とするPCR産物のDNA断片（約300bp）をゲル中から回収した。

【0080】得られたDNA断片をベクタープラスミドpBlue script SK (+) (Stratagene社製)のEcoRVで切断部位に挿入し、プラスミドpBSK1を得た。pBSK1中のEcoRI-KpnI-EcoRI断片の塩基配列を決定し、PCRで得たDNAが目的とする正しい配列を有していることを確認した。

【0081】プラスミドpBSK1をさらにEcoRIで切断し、得られた約150bpのDNA断片をpPAP142のEcoRI切断断片（約3800bp：アンビシリントリプトニン耐性遺伝子、lacプロモータ及びトランスアミナーゼ遺伝子の3'末端側を含む）と連結して、組換え発現プラスミドpPAP243を得た。

【0082】pPAP243は、lacプロモータの下流にバラコッカス由来トランスアミナーゼ遺伝子の翻訳領域及び3'非翻訳領域が正方向に連結されており、pPAP142におけるバラコッカス由来のプロモータ領域とロダニース様蛋白質をコードする領域が欠失している。

【0083】pPAP243において、lacプロモータ（配列番号3で示した塩基配列を有する）とバラコッカス由来トランスアミナーゼ遺伝子翻訳領域（配列番号

1の第1024～2205番目の塩基に相当する塩基配列を有する）との間の塩基配列は、配列番号5で示した通りである。

【0084】(3)発現プラスミドpPAP243を含む大腸菌形質転換株の取得

前項(2)で得た発現プラスミドpPAP243を、エシエリシア・コリ（Escherichia coli）HB101株に導入し、形質転換株 HB101 (pPAP243)を得た。

10 【0085】実施例2 トランスアミナーゼ発現プラスミドpPAP243を含む大腸菌形質転換株の培養物のトランスアミナーゼ活性

前記実施例1(3)で得たトランスアミナーゼ発現プラスミドpPAP243を導入した形質転換株HB101 (pPAP243) (実施例1(3)) のトランスアミナーゼ活性を測定した。

【0086】また、ロダニース様蛋白質をコードする領域などを除く前の発現プラスミドpPAP142 (実施例1(1))、ロダニース様蛋白質をコードする領域などは除かれているがプロモータ(lac)とトランスアミナーゼ翻訳領域との間の配列がpPAP243とは異なる対照発現プラスミドpPAP1416 (後記参考例1(1))、pPAP1417 (後記参考例1(2)) 及びpPAPS D61 (後記参考例1(3))について、これらを導入した形質転換株のトランスアミナーゼ活性を測定・比較した。

【0087】形質転換株の培養及びトランスアミナーゼ活性の測定は、以下のように行った。LBG寒天培地 (1%バクトリップトン、0.5%イーストエキストラクト、0.5%NaCl、2%グルコース、2%寒天)

20 20 【0087】形質転換株の培養及びトランスアミナーゼ活性の測定は、以下のように行った。LBG寒天培地 (1%バクトリップトン、0.5%イーストエキストラクト、0.5%NaCl、2%グルコース、2%寒天) で前培養した菌を一白金耳、生理食塩水4.5mlに懸濁した後0.5mlを生産用培地 (1%乳糖、0.2%ブドウ糖、0.5%L-グルタミン酸ナトリウム、2%コーンスチーブリガー、2%ミーストN、0.3%リン酸第1カリウム、0.7%リン酸第2カリウム、0.1%硫酸アンモニウム、0.025%硫酸マグネシウム・7水和物、0.03%カラリン、アンビシリントリプトニン耐性遺伝子、lacプロモータ及びトランスアミナーゼ遺伝子の3'末端側を含む) 50mlに植菌し、37°Cにて26.5時間振とう培養した。培養後、

30 30 培養液0.2mlを採取し、洗浄用液 (0.01%臭化セチルトリメチルアンモニウム、0.9%塩化ナトリウム) 4mlに添加して30°C、30分間インキュベートした。これを遠心分離した後上清4mlを除去し、残った菌体について、トランスアミナーゼ活性を測定した。

【0088】トランスアミナーゼ活性 (フェニルアラニン・トランスアミナーゼ活性) は、2-オキソ-4-フェニル酪酸を基質とし、L-グルタミン酸をアミノ供与体として、以下のように測定した。

【0089】前記被験菌体 (0.2ml) に基質溶液 (0.25M 2-オキソ-4-フェニル酪酸カリウム、0.3

75M L-グルタミン酸ナトリウムおよび0.125M ビリドキサール-5' -リン酸) 0.8mlを添加し、30°Cで30分反応させた後、1N塩酸4mlを添加して反応停止させた。これを蒸留水で適宜希釈した後、HPLC (Nucleosil 10C18カラム (4×250mm, MACHEREY-NAGEL社製)、移動相40 mMリン酸\*

\*カリウム (pH 2.5)/CH<sub>3</sub>CN [9/1]、流速1ml/分、検出波長254 nm)にて、反応生成物L-2-アミノ-4-フェニル酪酸を測定・定量した。

[0090] 測定結果を下記表1に示した。

[0091]

【表1】

発現プラスミド	プロモータ (lac) とトランスアミナーゼ翻訳領域との間の配列	大腸菌形質転換株のトランスアミナーゼ活性 (units/ml broth)
本発明 pPAP243	配列番号5	4.7
対照 pPAP142	配列番号4	2.2
pPAP1416	配列番号6	1.0
pPAP1417	配列番号7	0.3
pPAPSD61	配列番号8	2.5

[0092] 表1に示した通り、pPAP243をHB 20 101株に導入した形質転換株は、ロダニース様蛋白質をコードする領域などを除く前の発現プラスミドpPAP142を導入した株の約2.1倍の高い活性を示した。

[0093] また、pPAP243と同様にロダニース様蛋白質をコードする領域などは除かれているがプロモータとトランスアミナーゼ翻訳領域との間の配列がpPAP243とは異なる発現プラスミド、pPAP1416、pPAP1417及びpPAPSD61を各々導入した形質転換株では、pPAP243を導入した株の約1/2以下の活性しか認められなかった。

[0094] 実施例3 L-2-アミノ-4-フェニル酪酸の製造  
生産用培地 (1%乳糖、0.2%ブドウ糖、0.5%L-グルタミン酸ナトリウム、2%コーンスチーブリカーナ、2%ミーストN、0.3%リン酸第1カリウム、0.7%リン酸第2カリウム、0.1%硫酸アンモニウム、0.025%硫酸マグネシウム・7水和物、0.03%カラリンを含む培地 (pH 7.0)) 100ml に、前記実施例1の(3)で得た大腸菌形質転換株HB 101 (pPAP243)を1白金耳植種し、37°Cで26時間培養する。この培養液に2-オキソ-4-フェニル酪酸カリウム4.33g、L-グルタミン酸ナトリウム5.07gおよびビリドキサルリン酸2.65mgを添加後、アンモニア水でpH 8.8に調整し、更に30°Cで26.5時間静置して酵素反応を行う。2時間および5時間反応後に、それぞれ2-オキソ-4-フェニル酪酸カリウム2.16gとL-グルタミン酸ナトリウム2.54g (pH 8.8) を添加して反応を行う。反応後、コットンフィルターでろ過を行い、HClで溶解

後、活性炭処理して、5N NaClでpH 5.5に調整する。かくして収率約8.8%で光学活性体L-2-アミノ-4-フェニル酪酸の結晶を得ることができる。

[0095] 参考例1 対照トランスアミナーゼ発現プラスミドの調製

プロモータとトランスアミナーゼ翻訳領域との間の配列がpPAP143とは異なる発現プラスミドpPAP1416、pPAP1417及びpPAPSD61を以下のように調製した。

[0096] (1)pPAP1416の調製

実施例1(1)で取得した発現プラスミドpPAP142を、制限酵素KpnIおよびMluIで切断し、得られたDNA断片 (3890 bp: アンピシリン耐性遺伝子、lacプロモータ及びトランスアミナーゼ翻訳領域を含む) にリンカーDNA (KpnI-MluIリンカーダNA: 配列番号6の第70~84番目の塩基に相当) を連結して閉環し発現プラスミドpPAP1416を得た (調製方法の概略を図2に示した。)。リンカーダNAは、381A型DNA合成機 (アプライドバイオシステム社製) を用いてホスホアミダイト法によって合成したもの用いた (以下、同)。

[0097] 得られた発現プラスミドpPAP1416は、プロモータ (lac) 及びバラコッカス由来トランスアミナーゼ遺伝子の翻訳領域を含み、プロモータ (lac) とトランスアミナーゼ翻訳領域との間の塩基配列は、配列番号6で示した通りである。

[0098] (2)pPAP1417の調製

実施例1(1)で取得した発現プラスミドpPAP142を、制限酵素KpnIおよびMluIで切断した後、Mung bean nuclease (Mung bean nuclease) で処理して末端平滑化した。得られたDNA断片 (約3890 bp: A

17

ンビシリン耐性遺伝子、*lac*プロモータ及びトランスアミナーゼ翻訳領域を含む)にリンカーDNA(KpnI-平滑末端リンカーDNA:配列番号7の第70~88番目の塩基に相当)を連結して閉環し発現プラスミドpPAP1417を得た(調製方法の概略を図2に示した。)。

【0099】得られた発現プラスミドpPAP1417は、プロモータ(*lac*)及びバラコッカス由来トランスアミナーゼ遺伝子の翻訳領域を含み、プロモータ(*lac*)とトランスアミナーゼ翻訳領域との間の塩基配列は、配列番号7に示した通りである。

#### 【0100】(3)pPAPSD61の調製

実施例1(1)で取得した発現プラスミドpPAP142を、制限酵素KpnIおよびMluIで切断し、得られたDNA断片(約3.9kb:アンビシリン耐性遺伝子、*lac*プロモータ及びトランスアミナーゼ翻訳領域を含む)にリンカーDNA(KpnI-MluIリンカーDNA:配列番号8の第69~78番目の塩基に相当)を連結して閉環し発現プラスミドpPAPSD61を得た。

【0101】得られた発現プラスミドpPAPSD61は、プロモータ(*lac*)及びバラコッカス由来トランスアミナーゼ遺伝子の翻訳領域を含み、プロモータ(*lac*)とトランスアミナーゼ翻訳領域との間の塩基配列は、配列番号8で示した通りである。

#### 【0102】

【発明の効果】本発明の微生物は、従来のトランスアミナーゼ発現組換え微生物と比較して頭著に高いトランスアミナーゼ発現能及び生産能を有する。また、本発明の\*

\*微生物は、トランスアミナーゼ以外のバラコッカス・デニトリフィカンス由来蛋白質を発現しない点でも有利である。

【0103】本新規微生物を用いることにより、L-アミノ酸(L-2-アミノ-4-フェニル酪酸など)を工業的有利に製造できる。また、本新規微生物を用いることにより、L-アミノ酸を経由してN-置換アミノ酸誘導体アルキル及び2-オキソイミダゾリジン誘導体またはその薬理学的に許容しうる塩を工業的有利に製造できる。

#### 【0104】「配列表フリーテキスト」

##### 配列番号5のフリーテキスト

<223> ベクターの一部分とバラコッカス由来トランスアミナーゼ遺伝子翻訳領域の5'上流の一部分が融合した配列(Sequence of the fusion of a portion of a vector and 5' upstream part of the Paracoccus transaminase gene coding region)

#### 【0105】配列番号6、7及び8のフリーテキスト

<223> ベクターの一部分とリンカーとバラコッカス由来トランスアミナーゼ遺伝子翻訳領域の5'上流の一部分が融合した配列(Sequence of the fusion of a portion of a vector, a linker, and 5' upstream part of the Paracoccus transaminase gene coding region)

#### 【0106】配列番号9及び10のフリーテキスト

<223> 人工的に合成されたプライマーの配列(Artificially synthesized primer sequence)

#### 【0107】

##### 【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> TANABE SEIYAKU CO., LTD.

<120> Novel Microorganism and Process for Preparing L-Amino Acid Using the Same

<130> A00-4691

<140>

<141>

<150> JP013688/1999

<151> 1999-01-22

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

【0108】

<210> 1

<211> 2251

19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Paracoccus denitrificans

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1024) ..(2205)

&lt;400&gt; 1

gatcggcgtc gccaaggcca agaaggctgc cggacaaggccg gaaaccggcg ccaaggcgca 60  
 ctggaaaccgg cagaaacacg tttggctgaa gcaagggttaa gccttgccgc cccggcgccg 120  
 tggcggttaca tcgggtgtcg ttcttgccgc gggggggaaa ggccgtatgtc caccgattcc 180  
 gacgatccga aagtgttgtt ctcgaccgac tggctgccc cccatctqag cgatccccac 240  
 ctggcggtca tcgacgccc ac tggttccctg gggccggccg gggatggccg gggccaaatac 300  
 atggccgctc atatccccgg cggcccgctt cttcgacatc gacgagatcg cggacaaggcg 360  
 caqcaactgc cgcatatggc gccccaaqccc gggatgttca tcggccgcat gggcgccatg 420  
 ggcacatggcg acggccatca ggtgtgtatc tacgacaatt cggccgtcg ctcggcgccg 480  
 cggatctgggtt gggaccttcaa gctgtatgggc aaggcaaggacg tggcggtgtc gggacgcccgt 540  
 tcggccaaatg gctggccgaa gggccgcaaa tcggggacat gggccggatc ctggcgccacc 600  
 gggccatcac cgtgcaacgc cggccggccg tggtgccgtg acgtgaccca ggtcgccgca 660  
 gccaaggcaacg tggggccacca tggatgtcg gatgtggccgt cggccgaaacg ctggccggcc 720  
 gggccgaccg aaccggccggc cggccctggcc tcggggccaca tccccggctc gaaaaggccctg 780  
 cccttcggcc ggtctctacga ccaaggacggc acgtgaaat caccggatgc gtggccgccc 840  
 aattcgaaacg cggccggccgtg gacctgtcgaa aacccgtcat caccactgcg gtcggggatgt 900  
 gacggccggcc gtgtgtttcc tggcgcttga acgtgatcg gggccggacc attcgcttta 960  
 tggatgtcg tggggccgaaat gggggccgggtt cccggacctt aaaatcgaa cggggccgacg 1020  
 gtttggatgtcg tggggccgaaat gggggccgggtt cccggacctt aaaatcgaa cggggccgacg 1068

Met	Leu	Gly	Asn	Leu	Lys	Pro	Gln	Ala	Pro	Asp	Lys	Ile	Leu	Ala
1	5	10	15											

21

22

gqc gta ggg gtc tac aag gat gcc acc ggc cac acc ccq atc atq cqg 1164  
 Gly Val Gly Val Tyr Lys Asp Ala Thr Gly His Thr Pro Ile Met Arg

35

40

45

gcc gtc cac gcc gcc gag cag cgc atg ctg gaa acc gaa acc acc aag 1212  
 Ala Val His Ala Ala Glu Gln Arg Met Leu Glu Thr Glu Thr Thr Lys  
 50 55 60

acc tat gcc ggc ctc tcg ggc gag ccc gag ttc caa aag gcc atg ggc 1260  
 Thr Tyr Ala Gly Leu Ser Gly Glu Pro Glu Phe Gln Lys Ala Met Gly  
 65 70 75

gag ctg atc ctg ggc gac gga ctg aaa tcc gag acc acc gcq acq ctg 1308  
 Glu Leu Ile Leu Gly Asp Gly Leu Lys Ser Glu Thr Thr Ala Thr Leu  
 80 85 90 95

gcq acq gtc ggc ggc acc ggc gcc ctc cgg caq gcq ctg gaa ctg gcq 1356  
 Ala Thr Val Gly Gly Thr Gly Ala Leu Arg Gln Ala Leu Glu Leu Ala  
 100 105 110

cgc atq gcq aac ccg gac ctg cgg gtc ttc gtc aqc gat ccg acc tgg 1404  
 Arg Met Ala Asn Pro Asp Leu Arg Val Phe Val Ser Asp Pro Thr Trp  
 115 120 125

ccg aac cat gtc tcg atc atq aat ttc atq ggc ctg ccg gtg caq acc 1452  
 Pro Asn His Val Ser Ile Met Asn Phe Met Gly Leu Pro Val Gln Thr  
 130 135 140

tat cgc tat ttc gat gcc gaa acc cgc ggc gtc gat ttc gag ggc atg 1500  
 Tyr Arg Tyr Phe Asp Ala Glu Thr Arg Gly Val Asp Phe Glu Gly Met  
 145 150 155

aag gcc gac ctc gcc gcc gcq aaa aag ggc gac atq gtg ctg ctg cac 1548  
 Lys Ala Asp Leu Ala Ala Lys Lys Gly Asp Met Val Leu Leu His  
 160 165 170 175

gqc tgc tgc cac aac ccg acc ggc gcc aac ctg acq ctg gat caa tgg 1596  
 Gly Cys Cys His Asn Pro Thr Gly Ala Asn Leu Thr Leu Asp Gln Trp  
 180 185 190

gcc gaa atc gcc tcg atc ctg gaa aag acc ggc ggc ctg ccg ctg atc 1644  
 Ala Glu Ile Ala Ser Ile Leu Glu Lys Thr Gly Ala Leu Pro Leu Ile  
 195 200 205

gac ctg gcc tat cag ggc ttc ggc gac ggg ctg gaa gaa gac gac gcq gcc 1692  
 Asp Leu Ala Tyr Gln Gly Phe Gly Asp Gly Leu Glu Glu Asp Ala Ala  
 210 215 220

gqc acc cgg ctg atc gcc tcg cgc atc ccc gaa gtc ctg atc gcq gcc 1740  
 Gly Thr Arg Leu Ile Ala Ser Arg Ile Pro Glu Val Leu Ile Ala Ala

[0109]

<210> 2  
<211> 394  
<212> PRT  
<213> Paracoccus denitrificans

<400> 2

(14)

特開2000-270882

26

25

Met Leu Gly Asn Leu Lys Pro Gln Ala Pro Asp Lys Ile Leu Ala Leu  
 1 5 10 15

Met Gly Glu Phe Arg Ala Asp Pro Arg Gln Gly Lys Ile Asp Leu Gly  
 20 25 30

Val Gly Val Tyr Lys Asp Ala Thr Gly His Thr Pro Ile Met Arg Ala  
 35 40 45

Val His Ala Ala Glu Gln Arg Met Leu Glu Thr Glu Thr Thr Lys Thr  
 50 55 60

Tyr Ala Gly Leu Ser Gly Glu Pro Glu Phe Gln Lys Ala Met Gly Glu  
 65 70 75 80

Leu Ile Leu Gly Asp Gly Leu Lys Ser Glu Thr Thr Ala Thr Leu Ala  
 85 90 95

Thr Val Gly Gly Thr Gly Ala Leu Arg Gln Ala Leu Glu Leu Ala Arg  
 100 105 110

Met Ala Asn Pro Asp Leu Arg Val Phe Val Ser Asp Pro Thr Trp Pro  
 115 120 125

Asn His Val Ser Ile Met Asn Phe Met Gly Leu Pro Val Gln Thr Tyr  
 130 135 140

Arg Tyr Phe Asp Ala Glu Thr Arg Gly Val Asp Phe Glu Gly Met Lys  
 145 150 155 160

Ala Asp Leu Ala Ala Ala Lys Lys Gly Asp Met Val Leu Leu His Gly  
 165 170 175

Cys Cys His Asn Pro Thr Gly Ala Asn Leu Thr Leu Asp Gln Trp Ala  
 180 185 190

Glu Ile Ala Ser Ile Leu Glu Lys Thr Gly Ala Leu Pro Leu Ile Asp  
 195 200 205

Leu Ala Tyr Gln Gly Phe Gly Asp Gly Leu Glu Glu Asp Ala Ala Gly  
 210 215 220

Thr Arg Leu Ile Ala Ser Arg Ile Pro Glu Val Leu Ile Ala Ala Ser  
 225 230 235 240

Cys Ser Lys Asn Phe Gly Ile Tyr Arg Glu Arg Thr Gly Cys Leu Leu  
 245 250 255

Ala Leu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Arg Glu Leu Ala Gln Gly Ala Met  
 260 265 270

Ala Phe Leu Asn Arg Gln Thr Tyr Ser Phe Pro Pro Phe His Gly Ala  
 275 280 285

Lys Ile Val Ser Thr Val Leu Thr Thr Pro Glu Leu Arg Ala Asp Trp  
 290 295 300

Met Ala Glu Leu Glu Ala Val Arg Ser Gly Met Leu Arg Leu Arg Glu  
 305 310 315 320

Gln Leu Ala Gly Glu Leu Arg Asp Leu Ser Gly Ser Asp Arg Phe Gly  
 325 330 335

Phe Val Ala Glu His Arg Gly Met Phe Ser Arg Leu Gly Ala Thr Pro  
 340 345 350

Glu Gln Val Lys Arg Ile Lys Glu Glu Phe Gly Ile Tyr Met Val Gly  
 355 360 365

Asp Ser Arg Ile Asn Ile Ala Gly Leu Asn Asp Asn Thr Ile Pro Ile  
 370 375 380

Leu Ala Arg Ala Ile Ile Glu Val Gly Val  
 385 390

[0110]

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 3

tttacacttt atgcttccgg ctcgtatgtt gtgtg

35

[0111]

<210> 4

<211> 1094

<212> DNA

<213> Paracoccus denitrificans

<400> 4

gaatttgtgag cgataaca ttccacaca gaaacagcta tgcacatgtt acgttgcga 60

gctcggtacc cgatcggtgt cggcaaggcc aagaacctcg ccgacaaqcg cqaaaccgccc 120

gccaaggccg actggaaaccg gcaaaaacac gtttggtctga aqcaagggtta agccttgcgg 180

ccccggcgaa ctgcgggtac atcggtgtcg ttctgtcgcc cgcgggggaa aqcccgatgt 240

ccaccggattc cgacgatccg aaagtgtctgg tctcgaccga ctggctcgcc qcccatctqa 300

gcgatcccga cctgcgcgtc atcgacgcca cctgggttcct ggagcccccgc cgccatgtcgc 360

29

aqqccgaata catqccqct cataccccq acqqccqct ttttcqacat cqacqagatc 420  
 qcqqacaagc qcaqcaactq ccgcatacq cqccccqcc cqagatotc atcagccqca 480  
 ttcqccat qqacatcqgc qacqccatc aqqtctgtat ctacgacaat tcqcccotqc 540  
 gctcqccqac gcqggctcgq tggacattca agctgatogg caagcaggac gtggcggatqc 600  
 tggacqccgc ttccqcaaat qctqccgq aqccqccqaa atcgaggaca tqccqccgat 660  
 ccttcqccac cqccacatca ccgtqcaacq ccqccqccq ctqgtqacq gacgtqacc 720  
 aqqtccqccq aqccqcaaq ctqccqacc atqagatctg ctatqccqac tcqccqaaq 780  
 cttccqccq cqaggcggacc qaaccqccqog ccqccctqca ctcqaggcac atccccqct 840  
 cqaaaqccct qccttcggc cqgctctacq accaggacqg cacqctgaaa tcaccqatq 900  
 cqgtqccgccc qaattcqagg ccqccqccqgt qgacctgtcq aaacctgtca tcaccactqc 960  
 gqctcqgggg tqaqcqccqcc cqgtqctgttc ctqccqcttg aacqcatcqg qcaccqggac 1020  
 cattcqctt atqacqgaaq ctqggccqaa tggggcagg tccccqacq taaaatcqca 1080

1094

accqqaqacq cqta

[0112]

- <210> 5
- <211> 156
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

- <223> Sequence of the fusion of a portion of a vector and 5' upstream part of the Paracoccus transaminase gene coding region.

<400> 5  
 gaatttgtqag cqgataacaa tttcacacaq gaaacagcta tqaatqatt acqaattcq 60  
 tqaaggtaacc qggcaccggg accattcgct ttatgacggg aqctggccg aatggggcag 120  
 gttccccqac cttaaaatcq caaccqgaga cqata

156

[0113]

- <210> 6
- <211> 90
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> Sequence of the fusion of a portion of a vector,

特開2000-270882

(17)

31

a linker, and 5' upstream part of the Paracoccus transaminase gene coding region.

<400> 6

gaatttgtgag cggataacaa tttcacacag gaaacagcta tgacatgatt acgttgcga 60

gctcggtacc taaggagggtt taagcgctg

90

[0114]

<210> 7

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of the fusion of a portion of a vector, a linker, and 5' upstream part of the Paracoccus transaminase gene coding region.

<400> 7

gaatttgtgag cggataacaa tttcacacag gaaacagcta tgacatgatt acgttgcga 60

gctcggtacc taaggagggtt taagcttattg

90

[0115]

<210> 8

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of the fusion of a portion of a vector, a linker, and 5' upstream part of the Paracoccus transaminase gene coding region.

<400> 8

gaatttgtgag cggataacaa tttcacacag gaaacagcta tgacatgatt acgttgcga 60

gctcggtacc ttaaggagac gcgtg

85

[0116]

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially synthesized primer sequence.

<400> 9

gaaggatccg ggccaccggga ccattcgctt

30

[0117]

<210> 10

<211> 30

33

34

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Artificially synthesized primer sequence.

&lt;400&gt; 10

ggtttccaaqc atqcgctqct cggcggcqgtq

30

【0118】

【図面の簡単な説明】

【図1】トランスアミナーゼ高発現プラスミドpPAP

143の作製方法概略を示す模式図。

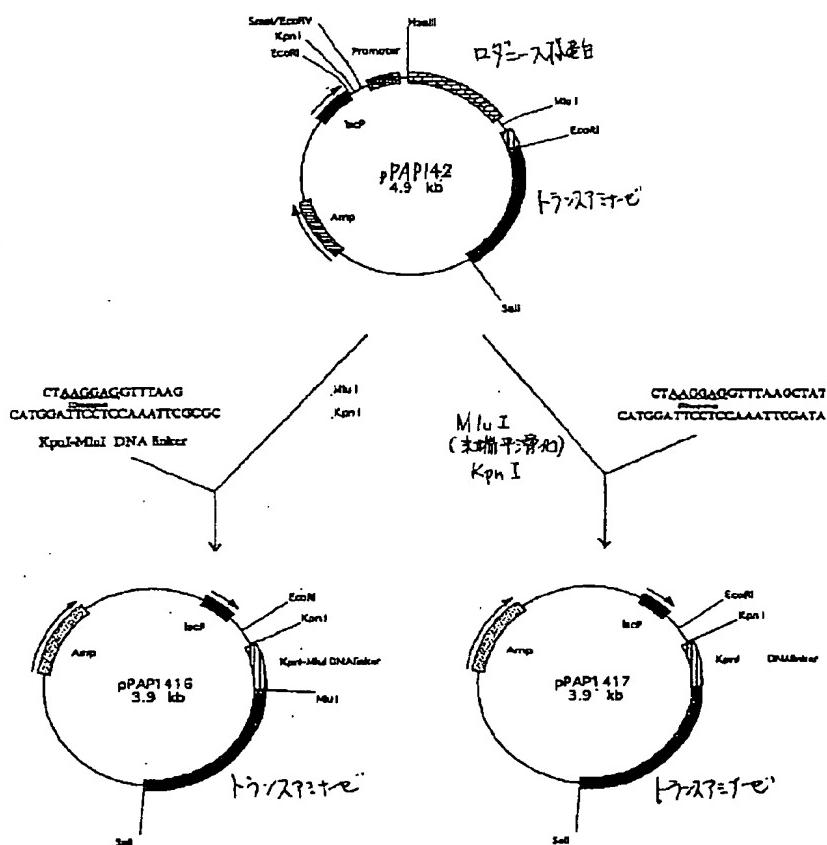
\* 【図2】対照トランスアミナーゼ発現プラスミドpPA

10 P1416及びpPAP1417の作製方法概略を示す

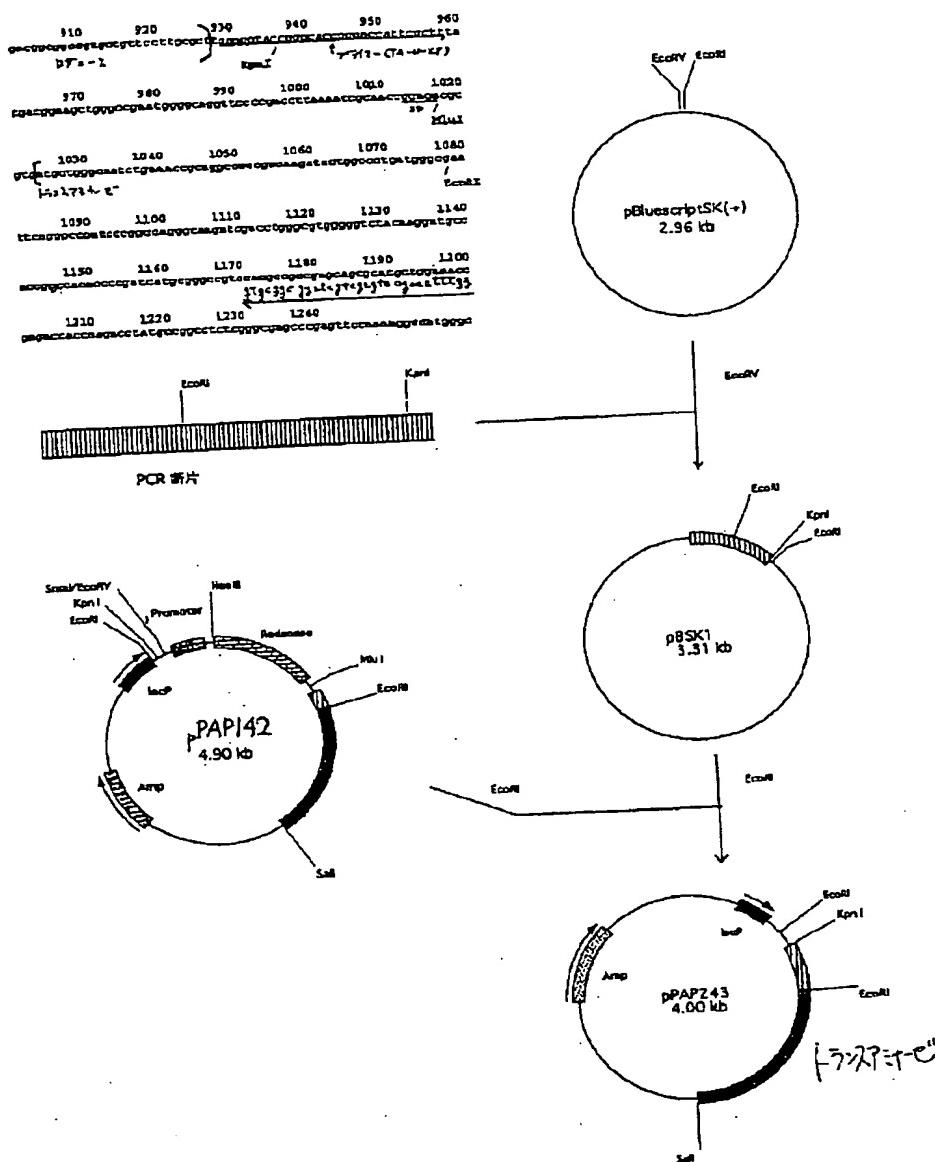
模式図。

\*

【図2】



[図1]



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>  
C 12 R 1:19)

識別記号

F I

マークド (参考)

(72)発明者 吉岡 龍蔵  
大阪府三島郡島本町東大寺3丁目80番2-  
306